

IVANA BOBIĆ

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

Kemijski odsjek
Prirodoslovno-matematički fakultet
Sveučilište u Zagrebu

NERIBOSOMSKA BIOSINTEZA PEPTIDA

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Marko Močibob

Zagreb, 2016.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

18. srpnja 2016.

Datum predaje korigirane verzije Završnog rada:

9. kolovoza 2016.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

23. rujna 2016.

Mentor rada: doc. dr. sc. Marko Močibob

Potpis:

Sadržaj

§ Sažetak	iv
§ 1. Uvod.....	1
1.1. Sintaza peptida	1
1.2. Usporedba ribosomske i neribosomske sinteze peptida	1
§ 2. Neribosomska biosinteza peptida.....	4
2.1. Strukturna raznolikost neribosomski sintetiziranih peptida	4
2.2. Struktura neribosomskih peptid-sintetaza	6
2.3. Konstrukcija hibridnih NRPS	19
§ 3. Literaturna vrela	20

§ Sažetak

Neribosomska biosinteza peptida biosintetski je put stvaranja peptida koji se ne odvija direktnom translacijom genetičke informacije. Taj neribosomski put sinteze koristi velike multifunkcionalne enzime, neribosomske peptid-sintetaze (engl. *nonribosomal protein synthetases*, skraćeno NRPS) koje nizom usklađenih enzimskih reakcija kataliziraju sintezu brojnih peptidnih produkata širokog raspona strukture i biološke aktivnosti. NRPS nalazimo uglavnom u stanicama bakterija i gljiva, a njihovi produkti važni su u medicinskoj primjeni kao antifungalni i antitumorski lijekovi (bleomicin) te antibiotici (vankomicin) i imunosupresori (ciklosporin).

NRPS kataliziraju stereospecifične i regiospecifične reakcije pomoću pojedinih katalitičkih domena koje aktiviraju, modificiraju međuprodukte, sudjeluju u elongaciji rastućeg peptida katalizirajući nastanak peptidne veze između pojedinih supstrata i njegovom otpuštanju sa samog enzima.

Istraživanjem strukture pojedinih modula i katalitičkih domena koje izgrađuju NRPS dobivamo uvid u mehanizam sinteze peptida te se omogućavaju bolja predviđanja krajnjih produkata sinteze, kao i razvoj hibridnih NRPS u svrhu sintetiziranja novih biološki aktivnih peptida.

§ 1. Uvod

1.1. Sinteza peptida

Proteini i peptidi su najvažnije molekule u živim organizmima jer su najsvestranije i obavljaju važne funkcije: djeluju kao katalizatori, prenose i pohranjuju druge molekule, daju mehaničku i imunosnu potporu, sudjeluju u prijenosu živčanih impulsa te kontroliraju rast i diferencijaciju stanicâ.¹ Proteini su polimeri čiji su gradivni blokovi aminokiseline međusobno povezane peptidnom vezom pa je stoga upravo ta veza najzastupljenija kemijska veza u organizmima.² Organizmi sintetiziraju proteine na golemim kompleksima - ribosomima, uz veliku sofisticiranost i preciznost. Osim translacijom glasničke RNA (mRNA) na ribosomima, peptidi se mogu sintetizirati na multifunkcionalnim enzimima koje nazivamo neribosomske peptid-sintetaze (NRPS) u procesu neribosomske biosinteze peptidâ. NRPS nizom usklađenih enzimskih reakcija kataliziraju sintezu brojnih peptidnih produkata širokog raspona strukture i biološke aktivnosti.

1.2. Usporedba ribosomske i neribosomske sinteze peptida

Za adiciju jedne aminokiseline (aa) na drugu ili na peptid potrebno ju je aktivirati. Takva reakcija zahtjeva utrošak adenzin-trifosfata (ATP) i nastaje jedan od dva moguća aktivna međuprodukta: aminoacil-AMP (u reakciji $aa + ATP \rightarrow aminoacil-AMP + pirofosfat$) ili aminoacil-fosfat (u reakciji $aa + ATP \rightarrow aminoacil-fosfat + ADP$). Aktivnosti stvaranja peptidne veze na ribosomima i na NRPS koriste kao aktivni međuprodukt aminoacil-AMP. U ribosomskom sustavu, aminoacilni ostatak prenosi se s aminoacil-AMP na odgovarajuću transportnu RNA (tRNA) uz pomoć enzima aminoacil-tRNA-sintetaze pri čemu nastaje stabilni međuprodukt aminoacil-tRNA. U NRPS sustavu, adenilacijska domena igra ulogu aminoacil-tRNA-sintetazâ, također aktivira aminokiseline kao acil-adenilate, iako nije evolucijski niti strukturno povezana s tRNA-sintetazama. Aktivirana aminokiselina prenosi se na kofaktor na protein-nosaču peptidila, dok kondenzacijska domena stvara peptidne veze između aminokiselina na susjednim joj protein-nosačima peptidila.²

Ribosomska sinteza peptida je proces u kojem se informacija iz nukleinske kiseline prevodi na jezik aminokiselina; molekula glasničke RNA (mRNA) služi kao kalup za sintezu proteina, odnosno određuje slijed aminokiselina u proteinu. Ribosomska sinteza proteina zahtjeva rad mnoštvo molekula, uključujući dakle mRNA, više različitih rRNA, tRNA, aminoacil-tRNA sintetazâ i proteinskih faktora. Aminoacil-tRNA-sintetaza je aktivacijski enzim – katalizira nastajanje aminoacil-AMP-a iz aminokiseline i ATP-a. Aminoacilnu skupinu aminoacil-AMP-a ovi enzimi potom prenose na tRNA, vežući je na 2'- ili 3'-hidroksilnu skupinu odgovarajuće tRNA. Tako nastaje aminoacil-tRNA (aa-tRNA). Elongacijski faktor EF-Tu donosi aa-tRNA na ribosom u obliku kompleksa kojeg čine aa-tRNA, EF-Tu i GTP koji se hidrolizira ako je došlo do pravilnog sparivanja baza između mRNA i aa-tRNA. Elongacijski faktor G (EF-G) ubrzava proces translokacije molekula tRNA i mRNA pri čemu se stvara peptidna veza. Nakon fazâ inicijacije i elongacije slijedi terminacija sinteze u kojoj sudjeluju faktori otpuštanja koji prepoznaju terminacijske kodone i hidroliziraju estersku vezu između polipeptida i tRNA.¹

Neribosomske peptid-sintetaze pokazuju analogiju sa ribosomskim sustavom. Adenilacijska domena prepoznaje aminokiselinski supstrat i aktivira ga kao aminoacil-adenilat uz utrošak ATP-a, odnosno uz otpuštanje pirofosfata. Aminoacil-adenilat se potom prenosi na protein-nosač peptidila, a s njega na kondenzacijsku domenu gdje se odvija proces kondenzacije. Kondenzacijska domena posjeduje akceptorsko mjesto za nukleofil i donorsko mjesto za elektrofil pa ju možemo funkcionalno usporediti s aminoacilnim mjestom (A-mjesto) i peptidilnim mjestom (P-mjesto) na ribosomu koja sudjeluju u istoj reakciji kataliziranja nastanka peptidne veze. Sinteza se terminira na TE-domeni procesom hidrolize ili makrociklizacije. I dok ribosomi trebaju kalup za sintezu proteina, tj. ovisne su o mRNA, NRPS su same kalup – redosljedom modula određeni su redosljedi vezanja supstrata u peptidni lanac.

Zbog uloge u primarnom metabolizmu organizma ribosomska sinteza zahtjeva visoku točnost, nisku razinu pogreške te brze i efikasne enzime. Točnost ribosomske biosinteze osigurava se aminoacil-tRNA-sintetazama koje su visoko specifične prema aminokiselinskim supstratima i tRNA. Ukoliko dođe do pogrešnog vezanja aminokiseline i tRNA, zbog postojanja dodatnog mjesta za popravak na enzimu (hidrolitičko mjesto) moguć je popravak

pogreške. Popravak se odvija bez disocijacije supstrata čime se osigurava da proces sinteze teče brzo i efikasno. Elongacijski faktor EF-Tu i pravilno sparivanje komplementarnih baza u kodonu mRNA i antikodonu tRNA također pridonosi vjernosti biosinteze. Velikoj brzini procesa pridonose ribosomi koji djeluju kao visoko procesivni enzimi – kataliziraju uzastopne reakcije translacije bez otpuštanja supstrata. Na ribosomima se tako sintetizira veliki broj različitih polipeptida ovisno o uputama dobivenih posredstvom mRNA (koja se sintetizira u procesu transkripcije koja prethodi procesu translacije) – takva složena ekspresija genskih informacija razlog je zašto je tijekom evolucije ribosomska translacija postala glavni, izrazito prilagodljiv mehanizam biosinteze peptida. Slijed aminokiselina u sintetiziranim peptidima moguće je i modificirati, npr. izmjenom nekih od triju nukleotida kodona za jednu aminokiselinu na mRNA, odnosno izmjenama genetskog koda mutacijama tripletâ u DNA ili pak programiranjem promjena okvira čitanja mRNA. Nedostatak ribosomske biosinteze peptida je uzak raspon gradivnih elemenata (20 aminokiselina), iako je peptide moguće modificirati posttranslacijski. NRPS sintetiziraju peptide koji mogu sadržavati neke od stotinu različitih supstrata, a istodobno se na enzimu, pored osnovnih domena, mogu nalaziti i mnoge modifikacijske domene, čime dobivamo još veći raspon supstrata za sintezu peptida.³ Evolucijski i strukturno prilagodljivim NRPS može se lako manipulirati zbog njegove modularne strukture čime je moguće razviti sustave za sintezu novih peptida, no takve ciljane modifikacije nisu uvijek uspješne i zahtjevaju veliko znanje o strukturama i međusobnim interakcijama njegovih modula. Važan nedostatak NRPS je sintetiziranje jednog peptidnog, uglavnom cikličkog produkta. Također, organizmima su takvi sustavi veliki energetska teret jer čak tri domene (jedan modul) ukupne veličine oko 1000 aminokiselina ugrađuje tek jedan monomer u peptidni lanac.

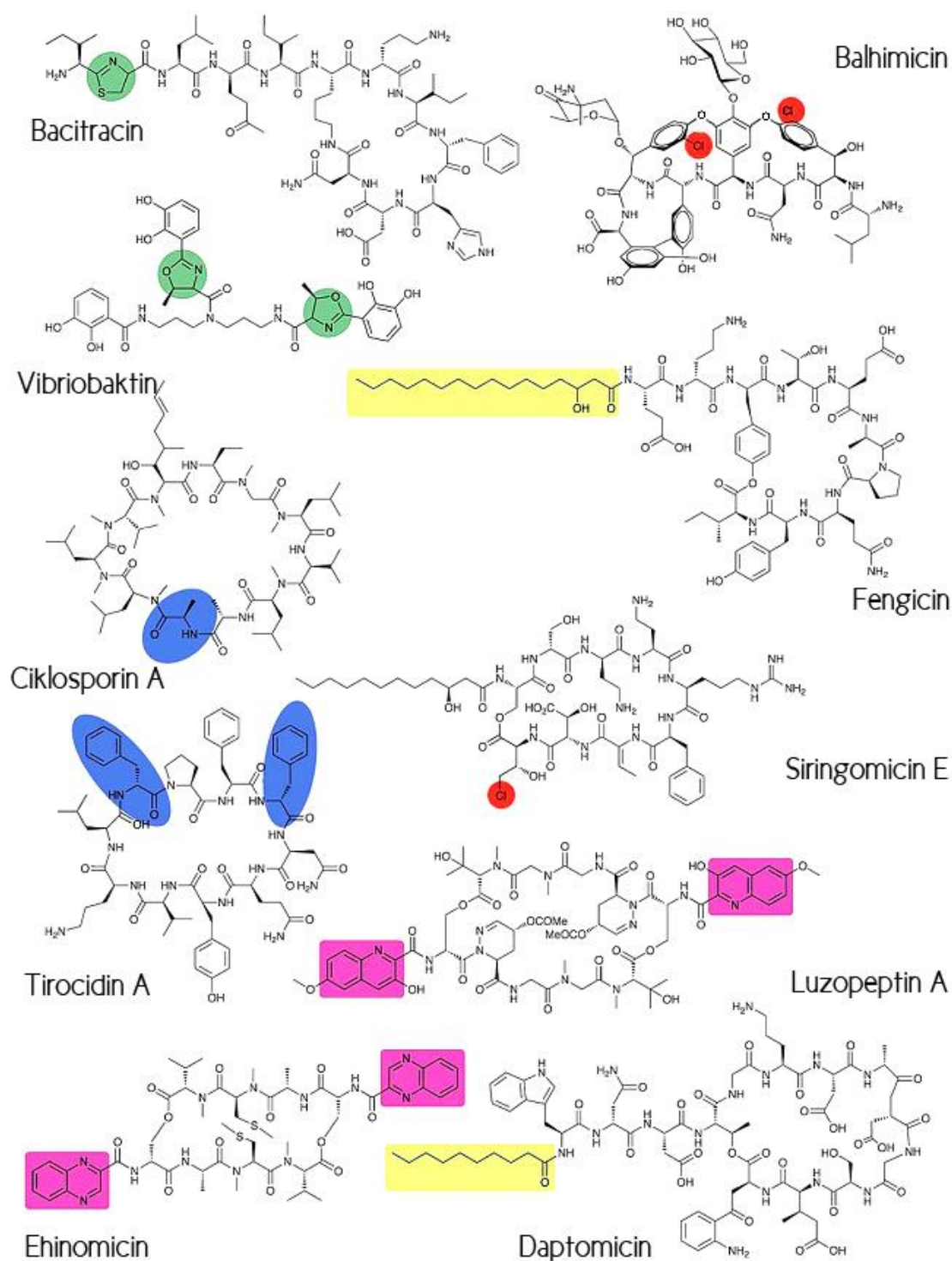
§ 2. Neribosomska biosinteza peptida

2.1. Strukturna raznolikost neribosomski sintetiziranih peptida

Neribosomski sintetizirani peptidi (engl. *nonribosomal peptides*, skraćeno NRP) su polimerni lanci koji sadrže uglavnom 2-48 aminokiselinskih ostataka. No proces neribosomske sinteze nije ograničen na samo 20 proteinogenih aminokiselina – oko petstotinjak različitih monomera moguće je ugraditi u peptid, uključujući neproteinogene aminokiseline (npr. ornitin i D-fenilalanin kod antibiotikâ tirocidina A i gramicidina S ili δ -(L- α -aminoadipinska kiselina) kod ACV-tripeptida), masne kiseline (kod surfaktina), α -hidroksilne kiseline, karboksilne kiseline (2,3-dihidroksibenzojeva kiselina kod siderofora enterobaktina, iz bakterije *Escherichia coli*, i miksokelina A) ili heterocikličke prstenove cisteinskih, serinskih ili treoninskih ostataka (kod bleomicina). Cistein, serin i treonin mogu se ugrađivati u peptide kao heterociklički prstenovi, a moguća je i prethodna modifikacija supstrata – toksin taksotomin A sadrži jednu N-formiliranu aminokiselinu. NRP mogu sadržavati i acetatne jedinice i propionatne skupine. Dodatna raznolikost struktura NRP posljedica je dodatnih izmjena strukture supstrata koji se ugrađuju u peptid, a mogu biti i glikozilirani nakon same sinteze.

Mnogi niži organizmi, prokarioti i niži eukarioti, sintetiziraju veliki broj metabolita, bilo primarnih ili sekundarnih. Reakcije koje nisu uključene u sami rast i razvoj stanice spadaju u sekundarni metabolizam, a produkti tih reakcija su sekundarni metaboliti. Takvi organizmi proizvode poliketide (PK), neribosomski sintetizirane peptide (NRP) ili hibride PK-NRP. NRP uglavnom proizvode gram-pozitivne bakterije roda *Actinomycetes*, *Streptomyces* i *Bacilli*, gljive i mikroorganizmi. No i neki viši eukarioti oponašaju proces ove sinteze – npr. enzim Ebony vinske mušice uključen je u metabolizam neurotransmitera, u miševima je nađen multifunkcionalni enzim U26 koji sudjeluje u katabolizmu lizina i dr. Bakterije koriste NRPS za sintezu peptida koju su od velike važnost, ne samo za njih same, već i za ljude. U NRP ubrajamo antibiotike, imunosupresive, antitumorske i antifungalne te citostatičke lijekove; takvi peptidi imaju korist u medicinskom liječenju. Od antibiotika poznati su fengicin i surfaktin, a ACV-tripeptid je prekursor antibiotikâ skupinâ penicilina i cefalosporina.³

Slika 1. prikazuje primjere NRP s različitim ugrađenim svojstvenim skupinama.



Slika 1. Raznolikost neribosomski sintetiziranih peptida s istaknutim strukturno svojstvenim skupinama koje određuju njihovu biološku aktivnost (žuto – masna kiselina; zeleno – tiazolinski ili oksazolinski heterociklički prsten nastao ciklizacijom cisteina ili treonina; plavo – D-aminokiselina; crveno – klor; purpurno – biciklički kromofor). Prilagođeno iz G. H. Hur *et al.*, *Nat. Prod. Rep.* **29** (2012) 1074-1098.

Antibiotik bacitracin sadrži tiazolinski prsten, a siderofor vibriobaktin dva oksazolinjska prstena. Imunosupresanti i antibakterijski lijekovi ciklosporin A i tirocidin A ciklički su peptidi koji sadrže D-aminokiseline (D-alanin odnosno D-fenilalanin). Ciklosporin A sadrži i ukupno sedam metiliranih amino-skupina. Fengicin i daptomicin koriste se protiv infekcija, a sadrže lanac masne kiseline. Balhimicin je glikopeptidni antibiotik koji sadrži dva atoma klora. Triciklička okosnica ovog peptida čini ga vrlo učinkovitim antimikrobnim lijekom. Siringomicin E, lipopeptidni fungicid, također sadrži halogeni element – atom klora. Biciklički kromofori koje sadrže luzopeptin A i ehinomicin omogućuju im interkalaciju u DNA pa se ti peptidi koriste kao antitumorski lijekovi.⁴

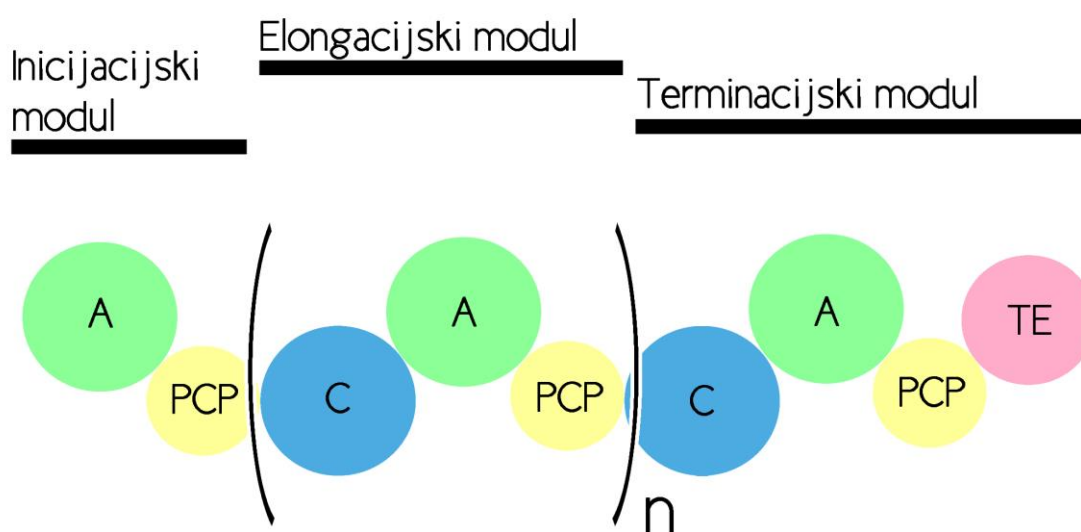
2.2. Struktura neribosomskih peptid-sintetaza

Geni koji kodiraju za NRPS organizirani su u klastere u koje su smješteni i drugi geni za različite enzime, a koji su povezani sa samom neribosomskom biosintezom peptida (npr. za enzime tioesteraze tipa II koje modificiraju tiolacijsku domenu NRPS-a i za 4'-fosfopanteteinil-transferaze koje kataliziraju reakcije posttranslacijskih modifikacija). Sekvenciranje gena provedeno je na više od 1000 bakterijskih genoma te je tako pohranjeno više od 1000 genskih klastera za NRPS.⁵

Neribosomske peptid-sintetaze građene su od domena organiziranih u module, od kojih je svaki zadužen za adiciju po jednog monomera u peptid (po potrebi i modifikaciju). NRPS katalizira sintezu peptida na način "montažne vrpce". Takav montažni proces NRPS možemo definirati kao slijed uzastopnih, povezanih djelatnosti ili operacija na zasebnim radnim mjestima (modulima) za sklapanje proizvoda (peptida) unaprijed definirane strukture. Operacije procesa montaže uključuju prepoznavanje, selekciju i aktivaciju supstrata, kontrolu (selektivnost i specifičnost prema određenim supstratima), rukovanje (prijenos među domenama), spajanje (stvaranja peptidnih veza) i operacije dorade (modifikacije supstrata). Tijek montaže definira slijed izvođenja montažnih operacija pa tako slijed modulâ i katalitičkih jedinica uvjetuje slijed monomerâ u konačnom peptidnom produktu. Zato uglavnom i broj katalitičkih modula odgovara broju monomernih jedinica peptida - kažemo da NRPS slijedi pravilo kolinearnosti. Dakle, NRPS sama djeluje kao kalup za sintezu peptida.⁶ Osim takvog klasičnog, linearnog tipa biosinteze (tip A NRPS), postoji i iterativna (tip B NRPS) ili nelinearna biosinteza (tip C NRPS). U NRPS tipa B, domene i moduli se koriste u iterativnim

koracima pa se sintetizirani produkt sastoji od ponavljajućih sekvenci, a nelinearni tip NRPS generiraju peptide u kojima sekvenca aminokiselina ne odgovara redoslijedu modula na kalupu NRPS. Također, moduli mogu biti organizirani na jednom polipeptidu (NRPS tipa I), npr. kod mnogih vrsta gljiva, ili na više zasebnih interagirajućih proteina (NRPS tipa II), npr. kod mnogih bakterijskih sustava.⁷

Postoje tri vrste modula: inicijacijski, elongacijski i terminacijski modul (slika 2.).



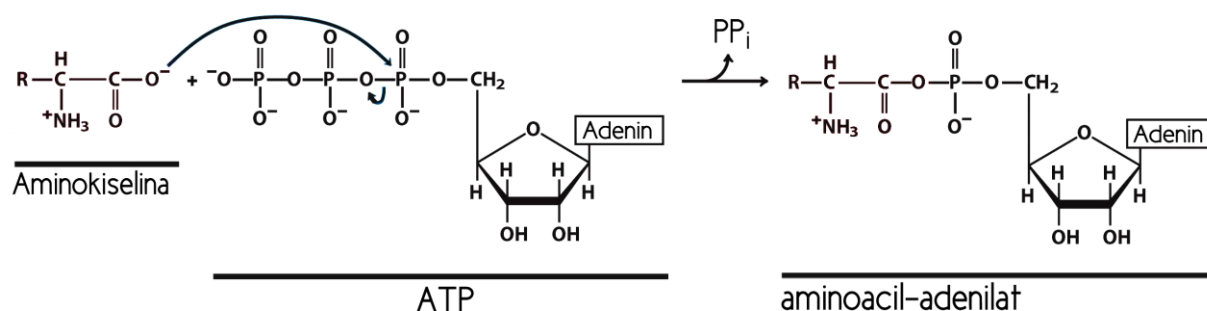
Slika 2. Shematski prikaz modularne organizacije neribosomskih peptid-sintetazâ.

Takozvani elongacijski modul sastoji se od tri esencijalne domene koje djeluju kao nezavisne katalitičke jedinice: adenilacijska domena (engl. *adenylation domain*, skraćeno A-domena), protein-nosač peptidila (engl. *peptidyl carrier protein*, skraćeno PCP) ili tiolacijska domena i kondenzacijska domena (engl. *condensation domain*, skraćeno C-domena). Adenilacijska domena prepoznaje aminokiselinski supstrat te ga aktivira kao aminoacil-AMP. Takav aktivirani međuprodukt veže se kovalentno na kofaktor 4'-fosfopantetein (engl. *4'-phosphopantetheine*, skraćeno 4'-PP), dugu prostetičku skupinu PCP-a. Kondenzacijska domena katalizira nastajanje peptidne veze, a na kraju sintetaze nalazi se tioesterazna domena (engl. *thioesterase domain*, skraćeno TE-domena) koja katalizira otpuštanje peptidnog produkta s enzima. Elongacijski modul dakle sadrži tri domene, TE-domena uključena je samo u terminacijski modul, dok inicijacijski modul sadrži samo A-PCP didomenu.

Uz esencijalne domene C, A, PCP i TE, u NRPS pojavljuju se i dodatne, modificirajuće domene koje su integrirane na razne lokacije unutar modula. Takve domene su epimerizacijska (E), *N*-metiltransferazna (Mt), C-metilacijska (C-Mt), ciklizacijska (Cy), oksidacijska (Ox) i formiltransferazna (F) domena.

2.2.1. Adenilacijska domena (A-domena)

A-domena sastoji se od približno 550 aminokiselina i kontrolira slijed aminokiselina (i drugih monomera) u konačnom peptidu jer je odgovorna za prepoznavanje i selekciju tih supstrata. A-domena sudjeluje u prvom koraku neribosomske biosinteze peptida aktiviranjem aminokiselinskog supstrata uz utrošak ATP-a i prisustvo Mg^{2+} (slika 3.).

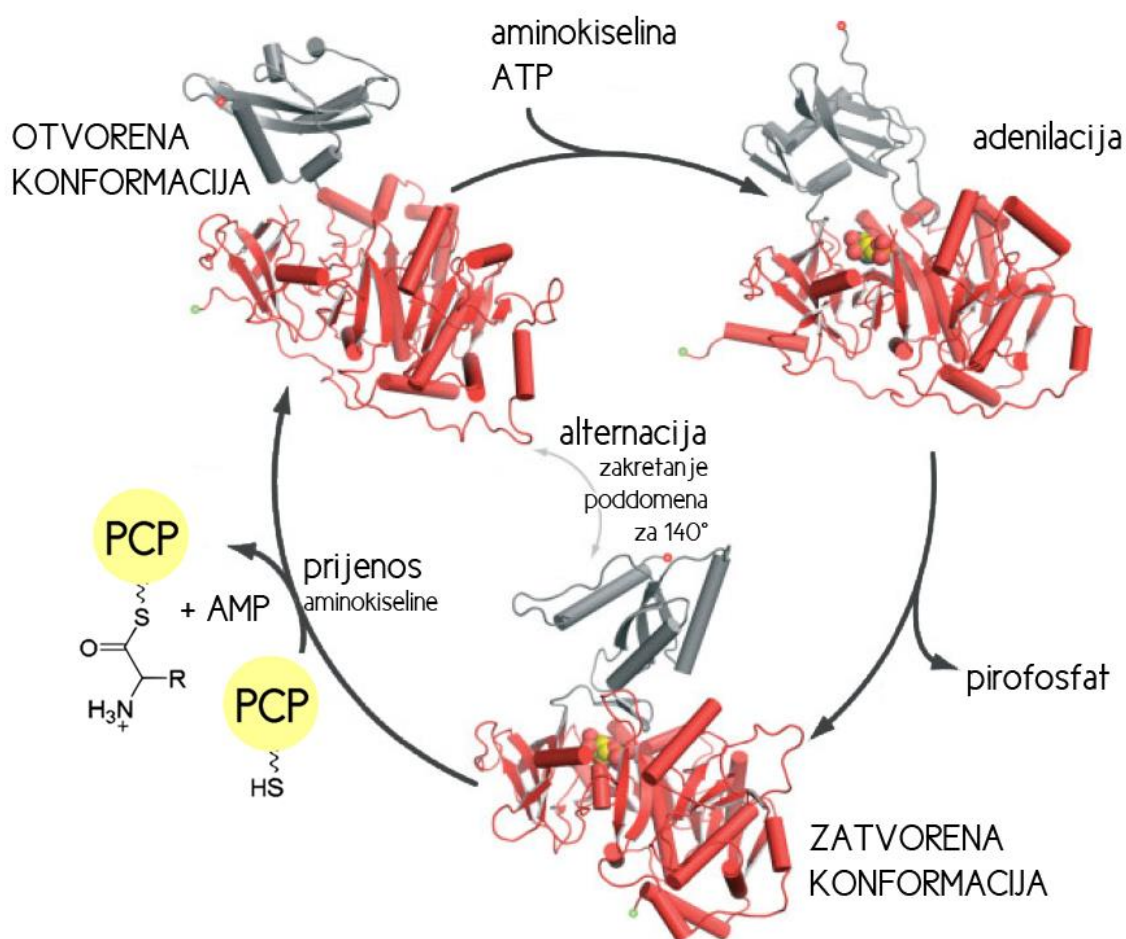


Slika 3. Reakcija nastanka aminoacil-adenilata koju katalizira adenilacijska domena.

Drugi korak uključuje tiolaciju supstrata, tj. vezanje aktivirane aminokiseline na slobodnu tiolnu skupinu 4'-PP kofaktora susjedne PCP-domene.⁸

A-domena je po enzimskoj aktivnosti slična aa-tRNA-sintetazama: oba enzima sudjeluju u katalizi reakcije aktivacije aminokiseline uz utrošak ATP-a i visoko su selektivni - za svaku aminokiselinu postoji po jedan specifični prenositelj. Ipak, ovi enzimi su evolucijski i strukturno nepovezani. A-domena je strukturno slična enzimima luciferazi iz *Photinus pyralis*, acil- i aril-CoA-sintetazama te 4-klorobenzoat-CoA-ligazi; ti enzimi spadaju u superobitelj adenilat-formirajućih enzima i zajedničko svojstvo im je što kataliziraju dvije nezavisne polureakcije. Struktura je među svima visokoočuvana - svi se sastoje od male C-terminalne (100 aminokiselina) i velike N-terminalne poddomene (450 aminokiselina), a podijeljena je na 10 regija (motivi A1-A10) od kojih je dio očuvan i unutar čitave superobitelji adenilat-formirajućih enzima. Manja, C-terminalna poddomena je fleksibilna, a između nje i N-

terminalne poddomene nalazi se hidrofobno aktivno mjesto. Interakcije među poddomenama ostvaraju se tek vodikovim vezama bočnih ogranka poddomena i molekulâ vode koje su smještene između samih poddomena. N-terminalna poddomena sastoji se od tri strukturna elementa: zakrivljene β -bačve te dvije β -ploče složene u peteroslojnu $\alpha\beta\alpha\beta\alpha$ strukturu. C-terminalna poddomena sadrži dvije α -zavojnice i dvije manje β -ploče. Prihvaćanjem supstrata i molekule ATP-a, odnosno u reakciji nastanka aminoacil-adenilata, C-terminalna poddomena zakreće se u odnosu na N-terminalnu za 140° u procesu alternacije poddomena. Tako domena prelazi iz otvorene u zatvorenu konformaciju, čime se nastali međuprodukt štiti od nespecifične hidrolize. Prijenosom aminoacil-AMP na PCP, domena se vraća iz zatvorene u otvorenu konformaciju (slika 4.).⁸



Slika 4. Konformacijske promjene tijekom katalitičkog ciklusa adenilacijske domene (sivo: C-terminalna poddomena; crveno: N-terminalna poddomena). Prilagođeno iz M. A. Marahiel, *J. Pept. Sci.* **15** (2009) 799-807.

Proučavana je kristalna struktura A-domene koja aktivira fenilalanin (PheA) iz gramicidin S-sintetaze A, GrsA iz bakterije *Bacillus brevis*. Otkriveno je da je ostatak od 100 aminokiselina smještenih između A4 i A5 podjedinice zaduženo za koordinaciju supstrata na samoj domeni.³ Istraživanjima krajem 20. stoljeća otkrivene su regije A-domene (8-10 ostataka unutar aktivnog mjesta) koje određuju i kontroliraju njenu selektivnost, a koje su očuvane unutar cijele superobitelji adenilat-formirajućih enzima. Dodatnim studijama omogućeno je predviđanje aminokiselinskog supstrata domene direktno iz njegove primarne sekvence.^{7,9}

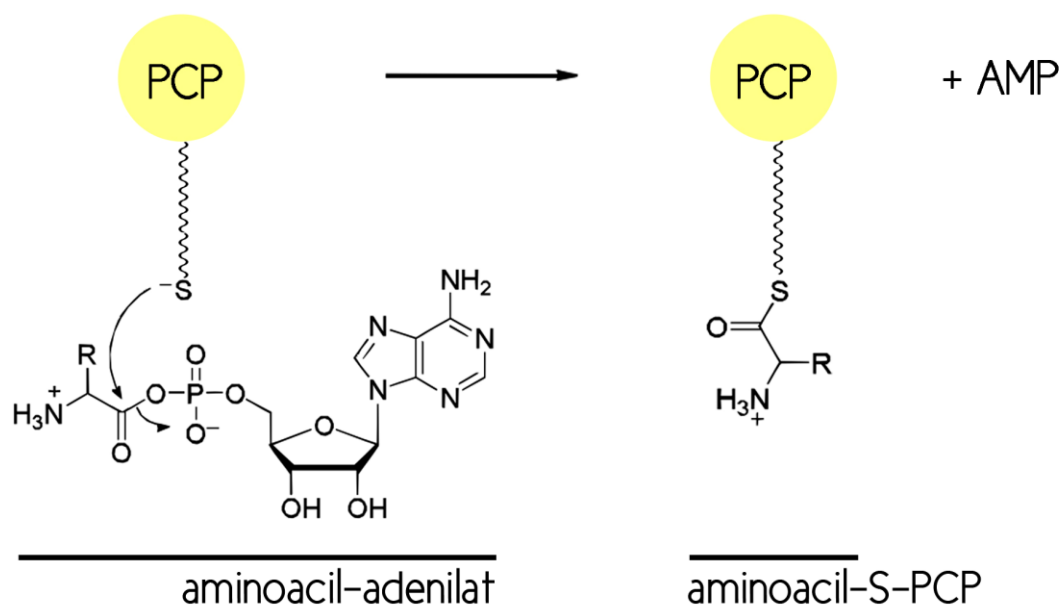
Rješavanjem kristalne strukture A-domene PheA u kompleksu s AMP i L-fenilalaninom otkrivena je struktura koja sadrži dvije podjedinice s očuvanim lizinom, Lys-517 u A10 motivu. Većina aminokiselinskih ostataka koji sudjeluju u prepoznavanju i vezanju supstrata nalazi se na N-terminalnoj poddomeni, no i nabijeni Lys-517 na C-terminalnoj poddomeni važan je za interakciju sa supstratima jer ih tako fiksira u aktivnom mjestu. AMP se na Lys-517 veže svojom fosfatnom skupinom, a hidroksilne skupine riboze stvaraju vodikove veze s aspartatom, Asp-413. Fenilalanin smješta se u hidrofobni džep interakcijama karboksilne skupine s Lys-517 te α -amino skupine s Asp-235, Gly-324 i Ile-330. Bočne strane veznog mjesta za fenilalanin s jedne strane čine Ala-236, Ile-330 te Cys-332, a s druge Ala-322, Ala-301 te Thr-278, dok je dno zatvoreno indolnim prstenom Trp-239.¹⁰

Osim strukture fenilalanin-aktivirajuće A-domene iz GrsA, riješene su strukture još dviju A-domena: domene za aktiviranje 2,3-dihidroksibenzojeve kiseline (DhbE) u bacilibaktin-sintetazi i domene NRPS-a gena *sidN* koji je otkriven u gljivici vrste *Neotyphodium lolii* koja aktivira N(Δ)-cis-anhidromevalonil-N(Δ)-hidroksi-L-ornitin.⁴

2.2.2. Protein-nosač peptidila (PCP) ili tiolacijska domena (T-domena)

Ova domena je relativno mala, grade ju 80-100 aminokiselina i najmanja je od svih domena NRPS. PCP sadrži veliku, esencijalnu prostetičku skupinu 4'-fosfopantetein (4'-PP) koja je posttranslacijski, kovalentno vezana na očuvani serinski ostatak (GGXS-motiv)⁹ protein-nosača (engl. *carrier* proteina, skraćeno CP), a nastaje iz koenzima A (CoA). Tu reakciju posttranslacijske modifikacije katalizira enzim fosfopanteteinil-transferaza (engl. 4'-phosphopantetheinyl transferase, skraćeno PPTaza) uz prisustvo Mg^{2+} .^{3,4}

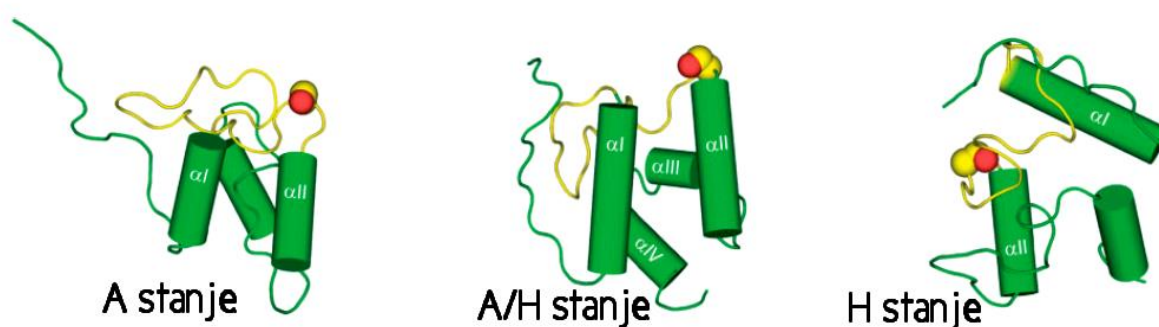
PCP-domena sudjeluje u prijenosu aktivirane aminokiseline koju dostavlja A-domena. Svi supstrati vežu na PCP u obliku tioestera pa nastaje kompleks aminoacil-S-PCP (slika 5.). Pritom 4'-PP djeluje kao pokretna ruka koja omogućava prienos kovalentno vezanog aminoacilnog i peptidilnog supstrata među katalitičkim centrima koja su udaljena i do 20 Å.⁸



Slika 5. Reakcija tiolacije aktivnog međuprodukta na prostetičku skupinu PCP-domene. Valovita crta predstavlja 4'-fosfopantetein, prostetičku skupinu PCP-domene.

Članovi superobitelji protein-nosača (CP) nazivaju se po supstratima koje prenose. Tako postoje ACP (protein-nosači acila) i PKS (poliketid-sintetaze) koji prenose acetatne, propionatne i malonatne skupine te AcCP (protein-nosači arila). Unatoč različitim zadaćama, članovi CP superobitelji su vrlo slični strukturom – sastoje se od četiri zavojnice međusobno položene u obliku snopa.⁸ Otkriveno je da zavojnica II najviše posreduje međusobnim interakcijama *carrier* proteina i drugih domena.³

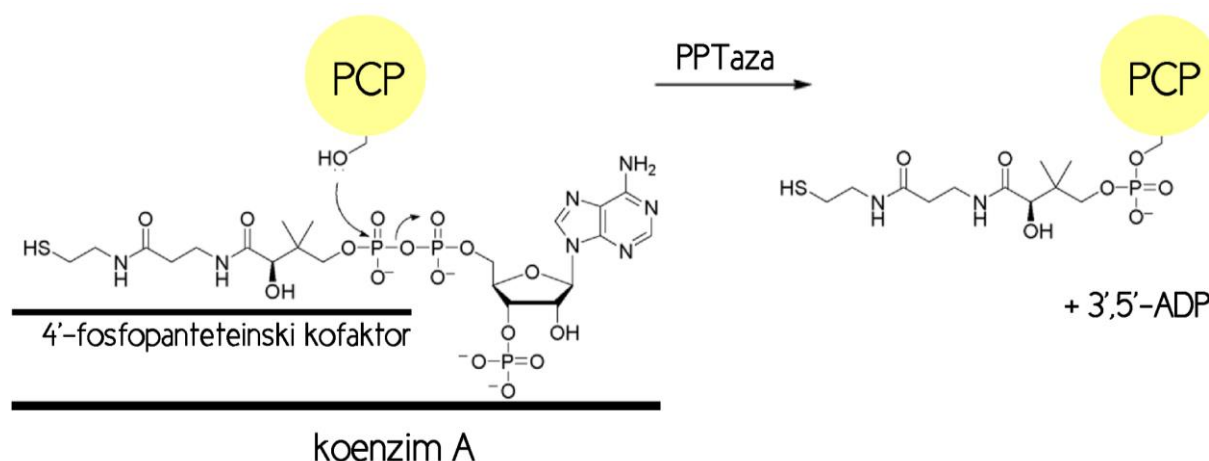
NMR snimanjima otkrivene su tri konformacije PCP-a ovisno o posttranslacijskom stanju: apo (A), holo (H) i apo/holo (A/H) (slika 6.).^{8,9}



Slika 6. NMR strukture PCP konformera. Preuzeto iz M. A. Marahiel, *J. Pept. Sci.* **15** (2009) 799-807.

Pokazalo se da se određeni partneri-enzimi vežu isključivo na A ili H konformer domene i zato se pretpostavlja da prostetička skupina 4'-PP ima ključnu ulogu u adaptaciji PCP-domene za interakciju s određenim partnerima.⁷ A/H konformer je prijelazni oblik A- i H-oblika, ima najkompaktniju i najstabilniju strukturu te rotacijom lako prelazi u A ili H konformer.⁸

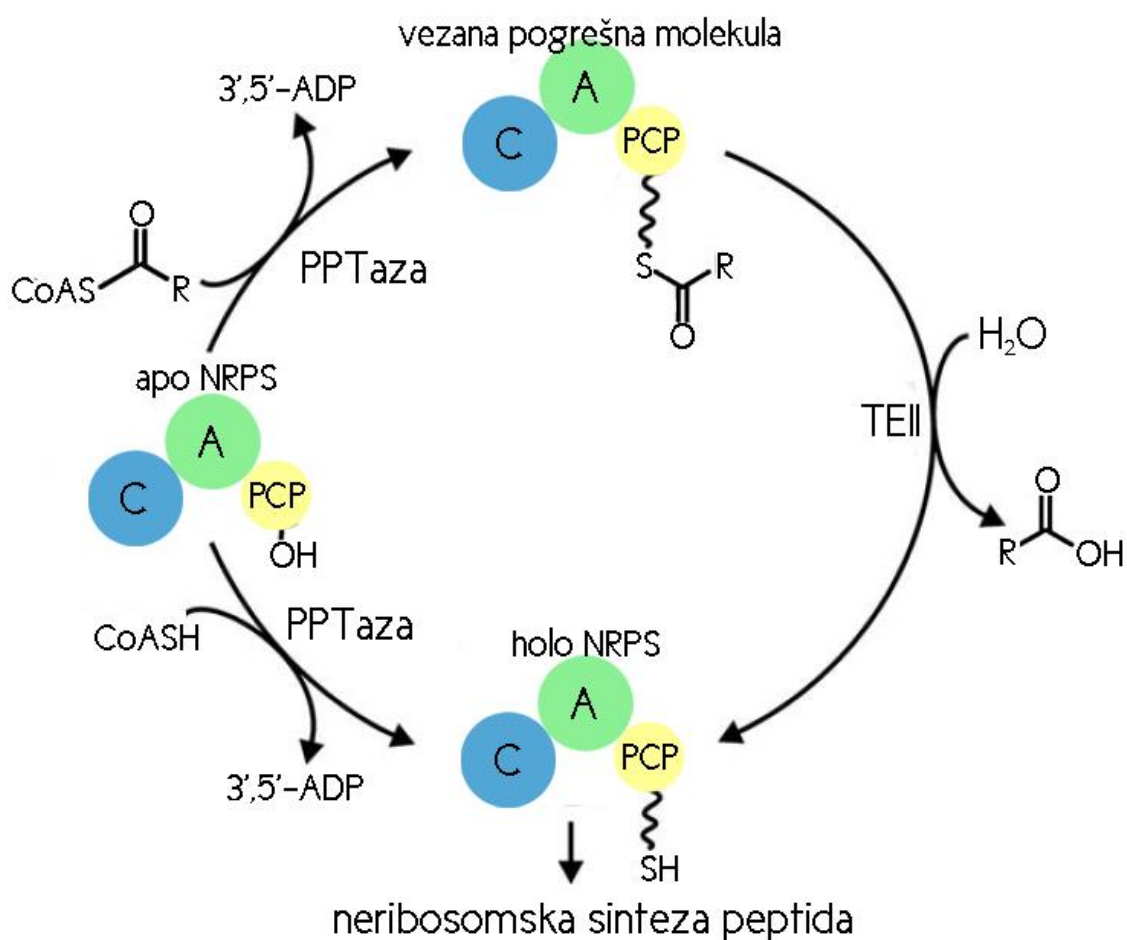
4'-PP kofaktor veže se na PCP-domenu pomoću enzima PPTaze. One koriste reducirani koenzim A (CoASH) kao donor fosfopanteteinske skupine (slika 7.).



Slika 7. Reakcija posttranslacijske modifikacije PCP-domene (engl. *priming*).

PPTaze nisu samo uključene u posttranslacijsku aktivaciju NRPS, već i u posttranslacijsku aktivaciju masnih kiselina i poliketid-sintetaza koje ne sadrže PCP-domene, nego protein-nosač acila i druge *carrier* proteine. PPTaze klasificirane su u tri skupine, prema veličini i selektivnosti prema supstratima. Prvu grupu predstavlja AcpS iz bakterije *E. coli*, a zajednička im je veličina od otprilike 120 aminokiselina i određena tolerancija za supstrate, uglavnom *carrier* proteine primarnog metabolizma. Druga grupa PPTaza sadrži enzime pseudohomodimerne strukture, veličine otprilike 240 aminokiselina, a modificiraju *carrier* proteine primarnog i sekundarnog metabolizma. Treća grupa sadrži enzime koji su dio eukariotskog sustava za biosintezu masnih kiselina. Enzim Sfp iz *B. subtilis* je najbolje opisani enzim druge skupine PPTaza. Ovaj enzim odlikuje velika tolerancija prema supstratima, vjerojatno zbog fleksibilne petlje koja se dobro prilagođava različitim tipovima *carrier* proteinâ. Reakcije koje provode PPTaze od esencijalne su važnosti jer ukoliko dođe do inaktivacije te modifikacije, NRPS gubi aktivnost uslijed onemogućenog nastanka PCP-S-acil međuprodukta.^{3,4} Tijekom reakcije prijenosa 4'-PP na apo-PCP, domena prelazi iz inaktivnog A- u aktivno H-stanje i takvom promjenom konformacije dolazi do relokacije 4'-PP na površini PCP-a za otprilike 100°, odnosno do pomaka za 16 Å čime se omogućava interakcija s drugim domenama unutar modula.⁸

Ukoliko dođe do vezanja pogrešne molekule (npr. acetiliranog 4'-PP) (engl. *mispriming*), na PCP djeluje enzim tioesteraza tipa II (TEII) koja popravljâ pogrešku čime se regenerira tiolna skupina na 4'-PP kofaktoru PCP-a u H-stanju (slika 8.).⁹ Na PCP-domeni može vezati i pogrešna aminokiselina koju također uklanjâ TEII hidroliziranjem acil- ili peptidil-skupine pa se PCP-domena oslobađa za prihvât novog, odgovarajućeg supstrata.⁴



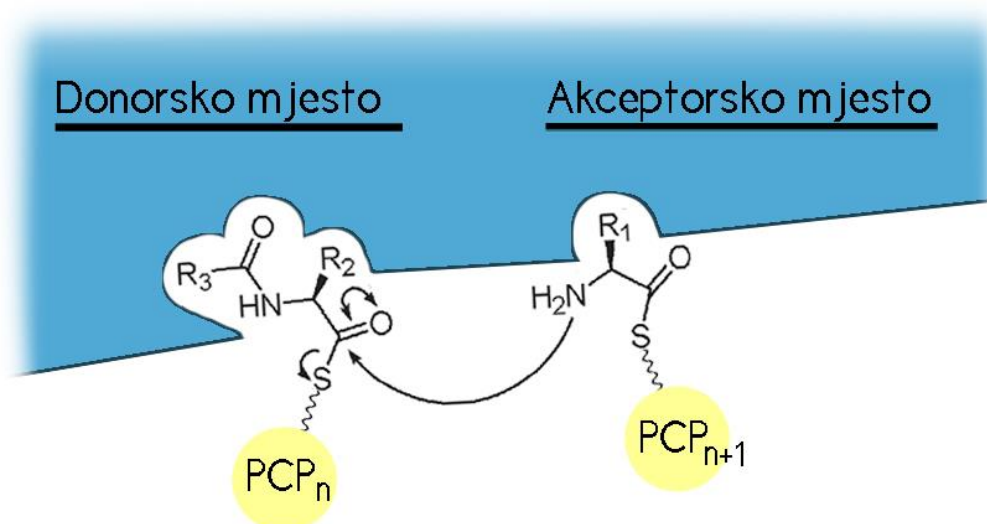
Slika 8. Reakcije posttranslacijske modifikacije PCP-domene i regeneriranje tiolne skupine kofaktora 4'-PP enzimom TEII nakon vezanja pogrešne molekule. Prilagođeno iz R. Finking i M. A. Marahiel, *Annu. Rev. Microbiol.* **58** (2004) 453-488.

2.2.3. Kondenzacijska domena (C-domena)

C-domenu grade oko 450 aminokiselina i, kao katalizator reakcije nastanka peptidne veze, ona je centralni dio NRPS sustava. Zato se broj C-domena u NRPS obično poklapa s brojem peptidnih veza u produktu. C-domena se uglavnom pojavljuje u elongacijskom modulu NRPS-a, ali može se naći i u inicijacijskom modulu NRPS koji sintetiziraju *N*-acilirane peptide (npr. plipastatin); tako kataliziraju reakciju *N*-aciliranja prve aminokiseline u lancu.⁶

Ova domena katalizira reakciju nukleofilnog napada amino-, imino- ili hidroksi-skupine aktivirane aminokiseline, smještene na PCP-u nizvodno od same C-domene, na acilnu skupinu aminokiseline na prethodnom modulu (uzvodno smještenoj PCP-domeni). Energija za nastanak peptidne veze osigurava se cijepanjem tioesterske veze. Struktura C-domene prilagođena je mehanizmu ovakve reakcije pa posjeduje akceptorsko i donorsko mjesto u

koje se smješta nukleofil odnosno elektrofil (slika 9.). Rastući peptidni lanac prebacuje se s donorskog na akceptorsko mjesto (peptid putuje nizvodno). Akceptorsko mjesto C-domene odgovorno je za selekciju pravilnog nukleofila, odnosno ono pokazuje veliku supstratnu selektivnost i to prema duljini bočnog lanca te L- i D-konfiguraciji supstrata. Selektivnost prema donoru (elektrofilu) nije u tolikoj mjeri izražena.^{4,8}



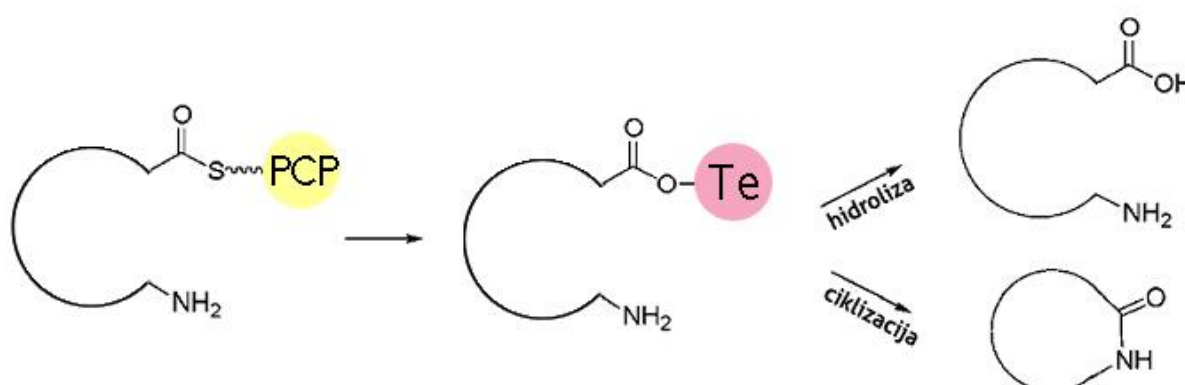
Slika 9. Shematski prikaz reakcije kondenzacije na kondenzacijskoj domeni između aminokiseline na PCP-u (n+1)-tog modula (akceptorsko mjesto) i peptidnog lanca na PCP-u n-tog modula (donorsko mjesto).

Pokazalo se da je C-domena oblika slova V sa strukturom sličnom kanjonu u koji se smještaju dva supstrata, donor i akceptor, te da postoji visokoočuvani slijed (motiv) HHxxxDG s katalitičkom ulogom – drugi histidin ovog motiva djeluje kao katalitička baza u reakciji formiranja peptidne veze. Takav visokoočuvani slijed nalazimo i u epimeraznoj i heterociklizacijskoj domeni NRPS.⁸ Proučavana je struktura C-domene enzima sintetaze vibriobaktina (VibH) i utvrđeno da sadrži N- i C-terminalnu poddomenu, a svaka je uređena kao troslojna $\alpha\beta\alpha$ struktura.³ Između poddomena nalazi se tunel koji sadrži aktivno mjesto, a u koji se smještaju 4'-PP kofaktori susjednih PCP-domena donoseći supstrate.⁷

2.2.4. Tioesterska domena (TE-domena)

Terminacija neribosomske sinteze peptida odvija se na TE-domeni, koja može biti zamijenjena varijantom C-domene ili reduktaznom domenom. Posljednji modul NRPS-a sadrži TE-domenu vezanu na C-terminalni kraj PCP-domene. Grade ju oko 250 aminokiselina.⁴

Slika 10. prikazuje proces oslobađanja peptida s enzimskog sustava pomoću TE-domene. Oslobađanje peptida ostvaruje se u reakciji u dva koraka gdje se kida tioesterska veza između peptida i 4'-PP kofaktora – peptidni lanac prenosi se na katalitički serin TE-domene uz nastajanje posljednjeg međuprodukta, acil/peptidil-enzim međuprodukta (acil/peptidil-O-Ser-TE).^{4,5} On potom podliježe intramolekulskom nukleofilnom napadu, pri čemu nastaje makrociklički produkt (npr. tirocidin A), ili hidrolizi, pri čemu nastaje linearni peptid (npr. vankomicin). Preferiran mehanizam je onaj nastanka makrocikličke strukture ponajviše stoga jer je on manje podložan proteolitičkom raspadu.⁸



Slika 10. Shematski prikaz reakcija nastanka acil/peptidil-enzim međuprodukta i njegove hidrolize ili ciklizacije kataliziranih TE-domenom.

Osim cikličkih i razgranatih cikličkih produkata (laktone i laktama, npr. enterobaktin), TE može otpustiti peptid i u obliku linearnih aldehida i alkohola ili cikličkih (lipo)proteina razgranatog lanca (npr. surfaktin A, bacitracin A).⁸

Proučavanjem strukture TE-domene u NRPS za surfaktin, Srf-TE, potvrđena je sličnost TE-domene s α/β -hidrolazama, kao što su esterase i lipaze. Srf-TE je globularni protein, a u aktivnom mjestu posjeduje kataličku trijadu sastavljenu od Ser-80, His-207 i Asp-107. Srf-TE može postojati u otvorenoj, O-konformaciji i u zatvorenoj, C-konformaciji. Otvorena konformacija prelazi u zatvorenu smještanjem poklopca kojeg čine tri α -zavojnice. Vjeruje se

da upravo taj poklopac, zajedno s aminokiselinskim ostacima Lys-111, Arg-120 i Pro-26 u aktivnom mjestu, onemogućuje nukleofilni napad vode pri čemu je preferirani krajnji produkt makrociklički.^{3,4}

2.2.5. Ostale modifikacijske domene

Osim osnovnih domena, u modulima NRPS-a možemo naći i neke od domena koje služe za modifikaciju supstrata. Modifikacijske domene su epimerizacijska (E), *N*-metilacijska (N-Mt), *C*-metilacijska (C-Mt), ciklizacijska (Cy), oksidacijska (Ox), formiltransferazna (F), redukcijaska (R) i druge.

E-domena se pojavljuje na C-terminalnom kraju modula i odgovorna je za modifikaciju L-aminokiselina u D-aminokiseline izmjenom α -C stereokemije. Taj enzim katalizira epimerizaciju L-aminokiseline vezane na kofaktor 4'-PP na PCP-u ili C-terminalne aminokiseline u rastućem lancu polipeptida. *N*- i *C*-metilacijske domene su enzimi metiltransferaze koje koriste *S*-adenozil-metionin (SAM) kao kofaktor, odnosno donor metilne skupine. One kataliziraju reakciju metiliranja α -amino skupine čime peptid postaje otporniji na proteolitičku razgradnju. N-Mt-domena uglavnom se nadovezuju na C-terminalnu regiju A-domena, a C-Mt-domena nastavljaju se na PCP-domenu. Cy-domena nije samo modifikacijska domena čija je uloga heterociklizacija cisteina, serina i treonina, već može zamijeniti C-domena katalizirajući tako nastanak peptidne veze. U procesu ciklizacije nastaje peteročlani ciklički adukt koji dehidratacijom prelazi u tiazolinski ili oksazolinski prsten.⁶ Ox-domena integrirana je u C-terminalnu regiju A-domena i katalizira reakciju oksidacije heterocikličkog prstena (npr. oksidaciju tiazolinskog prstena u tiazol). F-domena vezana je na inicijacijski modul i služi za formiliranje prve aminokiseline u lancu.⁸

2.2.6. Struktura i organizacija domena unutar modula

NRPS čine tri vrste modula: inicijacijski modul, elongacijski modul(i) i terminacijski modul. Inicijacijski modul sadrži samo A-PCP didomena, elongacijski modul sadrži najmanje tri domene (A-, PCP- i C-domena), a terminacijski modul sadrži još jednu esencijalnu, TE-domena. Uz poznavanje struktura pojedinih katalitičkih domena potrebno je istražiti cijele, intaktne module kako bi se utvrdile interakcije između domena i njihove prostorne orijentacije. Prvi takav istražen modul bio je terminacijski modul monomernog NRPS za

sintezu surfaktina (SrfA-C) kojeg tvore C-, A-, PCP- i TE-domena, odnosno 1274 aminokiseline. Ovaj modul zadužen je za aktivaciju i ugradnju terminalne aminokiseline L-leucina u krajnji produkt sinteze, ciklički lipopeptidni lakton, te njegovo oslobađanje s enzimskog sustava.⁸

Mutiranjem serina na koji veže 4'-PP u alanin smanjuje se mobilnost domena, PCP-domena se zadržava u apo-konformaciji te je tako omogućeno snimanje difrakcije rendgenskih zraka na kristalima. Dobivene informacije pružile su uvid u interakcije među domenama, njihovu međusobnu orijentaciju i prirodu poveznica (engl. *linker*) među njima. Utvrđeno je da su strukture domena iz terminacijskog modula SrfA-C istovjetne strukturama zasebno izdvojenih domena.⁷⁻⁹

Strukturna srž modula je pravokutna katalitička platforma koju čine C-domena i N-terminalni dio A-domene, pri čemu su njihova aktivna mjesta izložena s iste strane platforme. Domene su povezane interakcijama na površini od 1600 Å² (ref. 8) i linkerskom regijom od 32 aminokiseline. C-terminalni dio A-domene vezan je zajedno s PCP-domenom na platformu, a s N-terminalnom poddomenom povezuje se fleksibilnom linkerskom regijom od 15 aminokiselina čime je omogućena sloboda zauzimanja različitih konformacija tokom katalitičkog ciklusa.^{8,9} TE-domena vezana je na PCP-domenu linkerskom regijom od 9 aminokiselina.⁸

Aktivna mjesta A- i C-domene te aktivna mjesta C- i TE-domene razmaknute su na udaljenost koju ne može obuhvatiti 4'-PP kofaktor (60 Å odnosno 40 Å) pa su nužne velike strukturne promjene tijekom katalitičkog ciklusa.⁸ Po završetku reakcije adenilacije supstrata, rotacija N-terminalnog dijela A-domene na platformi dovodi do pomaka PCP-domene prema novostvorenoj regiji vezanja podjedinica A-domene. Zbog fleksibilne poveznice PCP-domena lako se rotira i pritom dolazi do reakcije aminoacilacije te domene. Tokom sljedeće rotacije C-terminalnog dijela A-domene, supstrat se prenosi s PCP-domene na C-domenu. Poznato je da C-domena može kontrolirati i utjecati na PCP-TE interakcije, no još uvijek nije poznato dolazi li do usmjeravanja supstrata na TE-domenu mehanizmom konformacijskih izmjena kao kod PCP-C prijenosa supstrata.⁷

2.3. Konstrukcija hibridnih NRPS

S porastom potrošnje i konzumacije antibiotikâ porastao je i broj rezistentnih patogenih bakterijskih sojeva, što povećava potrebu za novim, učinkovitim antibioticima. Primjenom informacija dobivenih sekvenciranjem genoma sojeva koji proizvode takve antibiotike moguće je promijeniti predložak za sintezu peptida, poboljšati, unaprijediti ili prilagoditi postojeće antibiotike te razviti hibridne NRPS u svrhu dobivanja novih spojeva od velike biološke važnosti.

Modularna struktura NRPS-a daje mogućnost manipulacije i modifikacije tog enzimskog sustava. Razvijene su rekombinantne metode kojima se izmjenjuju, spajaju ili izbacuju moduli iz NRPS sustava, ili se izmjenjuju segmenti u primjerice A-PCP jedinicama. Te rekombinantne metode uključuju zamjenu ciljanog gena za kodiranje aktivacijskog modula hibridnim genom. Hibridni gen kodira za novi aktivacijski modul koji pak aktivira drukčiji supstrat. Dakle, takvim metodama možemo dobiti nove hibridne NRPS koje će sintetizirati nove peptidne produkte. No sinteze na hibridnim NRPS završavaju uz malo iskorištenje, odnosno mali prinos produkata. Bolji rezultati dobiveni su fuzijom intaktnih modula ili fuzijom u poveznici između A- i PCP-domena. Poveznice ili linkerske regije, veličine otprilike 15 aminokiselina, predstavljaju mostove koji povezuju pojedine domene. Oni nemaju nikakvu funkcionalnu ulogu u NRPS pa se koriste kao optimalna veza između modula u konstrukciji hibridnih NRPS.

Pri konstrukciji hibridnih NRPS mora se voditi računa o selektivnosti domena. Ciljanom mutagenezom aminokiselina u veznom džepu A-domene može se, primjerice, promijeniti selektivnost i specifičnost postojeće A-domene. Na odabir supstrata prvenstveno utječe struktura aktivnog mjesta A-domene, no i supstratna selektivnost C-domene rezultira smanjenom kataličkom učinkovitošću sustava, odnosno smanjenom prinosu reakcije.³

Novogeneriranim sintetazama dobiven je veliki broj NRP derivata, no takve sintetaze pokazuju slabu supstratnu selektivnost i neispravne protein-protein interakcije pa se poboljšanja tehnika mogu očekivati s novim saznanjima o strukturnim i mehanističkim karakteristikama strategija u neribosomskim peptid-sintetazama.⁷

§ 3. Literaturna vrela

1. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, 1. hrvatsko izdanje, Školska knjiga, Zagreb, 2013, str. 857-889.
2. S. Hashimoto, *J. Biol. Macromol.* **8**(2) (2008) 28-37.
3. R. Finking, M. A. Marahiel, *Annu. Rev. Microbiol.* **58** (2004) 453-488.
4. G. H. Hur, C. R. Vickery, M. D. Burkart, *Nat. Prod. Rep.* **29** (2012) 1074-1098.
5. C. T. Walsh, M. A. Fischbach, *J. Am. Chem. Soc.* **132** (2010) 2469-2493.
6. M. A. Fischbach, C. T. Walsh, *Chem. Rev.* **106** (2006) 3468-3496.
7. K. J. Weissman, *Nat. Chem. Bio.* **11** (2015) 660-670.
8. M. A. Marahiel, *J. Pept. Sci.* **15** (2009) 799-807.
9. M. Strieker, A. Tanović, M. A. Marahiel, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **20** (2010) 234-240.
10. E. Conti, T. Stachelhaus, M. A. Marahiel, P. Brick, *EMBO J.* **16** (1997) 4174-4183.